



КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУКЦИИ QUALITY CONTROL AND PRODUCT SAFETY

УДК 576.800.6:619.9

НОВЫЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ ПРОТИВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА



¹А.С. Жумаш,
д-р вет. наук, проф.

³К.К. Ахметов, д-р биол. наук, проф.

¹А.К. Шайымбетова, канд. вет. наук

²А.С. Донченко, акад. РАН



²Н.А. Донченко,
д-р вет. наук, проф.

¹ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт»
²ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН
³Павлодарский государственный университет им. С. Торайгирова

Ключевые слова: микобактерия, медведка, вытяжка, антибактериальный препарат.

В статье рассмотрена эпизоотическая ситуация по туберкулезу крупного рогатого скота в Республике Казахстан. Приведены ареалы распространения медведки в республике. Определены химический состав вытяжки из хитинового покрова и внутреннего содержимого медведки, а также их биохимические показатели. Проведены бактериологические исследования на питательных средах путем добавления в среду соответствующих растворов из вытяжки медведки и культивирования на них референтных штаммов микобактерий.

THE SEARCH FOR ECOLOGICALLY CLEAN ANTIBACTERIAL DRUG AGAINST MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

¹A.S. Zhumash, ²N.A. Donchenko, ³K.K. Akhmetov, ¹A. K. Shaimbetova, ²Donchenko A.S.

Key words: mycobacterium, mole cricket, extraction, antibacterial drug.

The article presents the epizootic situation of tuberculosis of cattle in Republic of Kazakhstan. Outlined areas of distribution mole crickets in the Pavlodar region. Determine the chemical composition of the

extraction of chitin cover and internal content of mole crickets as well as biochemical indicates of extracts. Conducted bacteriological research on nutrient media by adding the environment to appropriate solutions from the extraction of mole crickets and culturing them reference strains MT.

Успешное развитие животноводства не представляется возможным без обеспечения ветеринарного благополучия по заразным заболеваниям. Нестабильная эпизоотическая обстановка в ряде областей Республики Казахстан и приграничных странах является основной угрозой для увеличения поголовья животных, повышения продуктивности скота и получения высококачественной животноводческой продукции.

Программой развития агропромышленного комплекса на 2013–2020 гг. предусмотрено повышение производства мяса до 160 000 т, молока – до 1,5 млн т.

Достижение устойчивого экономического роста, повышение качества жизни населения, обеспечение продовольственной безопасности страны являются глобальными проблемами экономики. Поэтому борьба с эпизоотиями и профилактика инфекционных и паразитарных болезней являются основой успешного развития животноводства. Благодаря улучшению гигиенических условий, подъёму уровня жизни, появлению новых антибиотиков и развитию хирургических методов лечения туберкулез начал резко снижаться. Однако в конце XX в. произошло новое резкое увеличение заболеваемости туберкулезом людей, чаще регистрируются лекарственно-устойчивые штаммы туберкулеза, и это приняло характер мировой пандемии, способной дестабилизировать общество.

Для борьбы с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза в последние годы ведутся интенсивные работы с целью повышения антимикобактериальной активности противотуберкулезных препаратов с применением экологически безопасных, доступных и эффективных средств и методов профилактики и терапии туберкулеза.

Одним из направлений поиска экологически чистых противотуберкулезных препаратов является средство, полученное из медведки обыкновенной (*Gryllotalpa gryllotalpa*), способствующее максимальному уничтожению микобактерий туберкулеза, и создание более эффективных лекарственных препаратов, в том числе и для животных.

Китайцы, дунгане и казахи, живущие в Китае, более 1500 лет применяют для лечения туберкулеза порошок, приготовленный из медведки.

При этом решающая роль принадлежит содержащемуся в теле медведки ферменту феразе, который растворяет восковидную оболочку туберкулезной палочки.

В этом направлении ученые Великобритании и США разработали новый класс медицинских препаратов, атакующих туберкулезные бактерии. В этих препаратах основную роль играет фермент GlgE, который подавляет большие объемы производства сахара в клетках *Mycobacterium tuberculosis*. Поскольку в организме людей нет этого фермента, он не вызывает побочных эффектов у людей.

В связи с запрещением применения синтетических препаратов для профилактики туберкулеза животных, значительным распространением микобактерий-мутантов (мультирезистентных штаммов), устойчивых ко всем имеющимся противотуберкулезным препаратам, необходима отработка эффективной методики получения активного вещества из вытяжек медведок.

Цель исследования – выяснение распространения туберкулеза животных в различных областях Республики Казахстан, изучение ареала распространения, биологии, экологии медведки обыкновенной на территории Павлодарской области, а также состава веществ тела медведки.

Павлодарская область расположена в северо-восточной части Казахстана и занимает территорию более 127,5 тыс. км². Преобладающими почвами в области являются темно-каштановые.

вые, которые к северу переходят в мало- и среднегумусные черноземы. Климат резко-континентальный. Распределение осадков по территории весьма неравномерное.

Основной водной магистралью области является р. Иртыш. В области насчитывается около 1200 озер, из которых пресных 32%, остальные соленые.

В мире насчитывается более 100, а на территории СНГ регистрируется 4 вида медведок [1, 2].

Большое количество обыкновенной медведки встречается в Алматинской, Актюбинской, Кызылординской и Павлодарской областях.

Медведка – насекомое отряда прямокрылых. Ее тело крупное, длиной 3–5 см, сверху темно-бурого цвета, а снизу буро-желтое. Брюшко примерно в 3 раза больше головогруды, мягкое, веретенообразной формы. У нее крепкие ротовые челюсти; передние ноги копательные, усики короткие. Ведет подземный образ жизни, вечером с наступлением темноты выходит на поверхность земли. Живет в поймах рек, часто селится на огородах и в садах, нанося большой вред корневой системе культурных растений. Медведка может перелетать на значительное расстояние, а также быстро плавает в воде. Питается в основном подземными животными: насекомыми, червями. Для откладки яиц самки устраивают в земле шарообразное гнездо на глубине 10–20 см, через 10–12 суток отрождаются личинки, которые и зимуют. В таком гнезде можно найти от 100 до 600 вылупившихся из них молодых медведок. В летний период медведки роют свои ходы неглубоко под землей, но на зиму как личинки, так и взрослые копают длинные ходы, расположенные под углом 45–60° к поверхности, глубиной от 25–60 см до 1 м [3].

Распространение медведки изучали на территории всей области (10 районов и 3 территории административного подчинения городам Павлодар, Аксу, Экибастуз). Было исследовано 18 местонахождений, которые в основном приурочены к соленым и пресным озерам. Собрано 508 медведок, из них ларва – 197, имаго – 311, яйца – 2 кладки. Сборы насекомых осуществлялись в дневное время (механическим способом – выкапывание из почвы) и с наступлением сумерек на «светоловушки». Самая многочисленная популяция медведки обнаружена на соленом озере Маралды Шарбактинского района (на 1 м² от 10 до 15 особей). Процветание медведки на озере Маралды связано с более богатым белковым питанием, поеданием медведкой рачка *Artemia salina*, обитающего в водах озера в изобилии. Береговая линия очень богата разнообразными органическими остатками и корнями разных растений.

Распространение туберкулеза в Республике Казахстан. По данным Ассоциации ветеринарной медицины, в мире на первое десятилетие XXI в. выделено более 64000 стойких очагов туберкулеза скота.

Торговля животными и животноводческой продукцией внутри страны и за ее пределами требует обязательного учета современной эпизоотической ситуации по хроническим инфекциям и инфекционным заболеваниям сельскохозяйственных животных с целью гарантирования безопасности животных и животноводческой продукции.

Эпизоотологическая обстановка по туберкулезу крупного рогатого скота по Республике Казахстан считается стабильной. В 2011 г. из обследованных 12369722 животных выделено 481 голов, реагировавших на ВТП, соответственно в 2012 г. – 816, из них у 529 (64,8%) случаев подтвержден туберкулез, в 2013 г. – 1562, из них в Костанайской области – 1178, в Северо-Казахстанской 190; за 2014 г. – 313 животных.

Неблагополучными по туберкулезу объявлены ТОО «Приреченское» Костанайской области, КХ Черкашина З. Е. Алматинского и населенный пункт Сулу Мадина Карагандинской области.

В ТОО «Уштобе-Айдын», КХ «Матыбай» Алматинской области было выделено 54 головы крупного рогатого скота, реагировавших на туберкулин с утолщением кожной складки от

5 до 15 мм. При убое 5 коров, принадлежащих первому хозяйству, было установлено специфическое туберкулезное поражение средостенных, бронхиальных лимфатических узлов и легких (рис. 1).

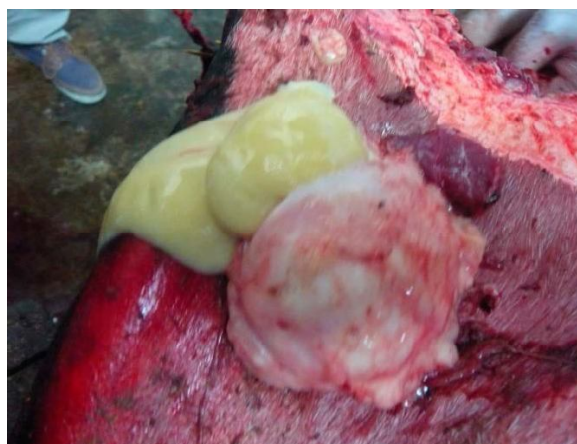


Рис. 1. Гнойно-некротический туберкулез заглочного и средостенного лимфатического узла

Во втором хозяйстве на вскрытии туберкулезных поражений не обнаружили, но из биоматериалов, взятых от 2 коров, выделены культуры микобактерий бычьего вида (рис. 2).



Рис. 2. Рост культур микобактерий *M. bovis* шт. 8 в молоке

По Актюбинской области при исследовании 600030 голов крупного рогатого скота и 14900 верблюдов реагирующих на туберкулин не выявлено.

В убойном пункте «Есик» при ветсанэкспертизе туш среди сданного частного скота туберкулез обнаружен у скота из пос. Жанакала Западно-Казахстанской области, из пос. Новый Актюбинской области и у животных с частных подворьев в г. Актюбинске, в КХ «Жакып» Ойылского района этой же области.

При нашем контрольном исследовании 473 коров, принадлежащих СПК Мартукского района, реагировало 12 (2,5%) коров с утолщением кожной складки на 3–7 мм. При переисследовании симультанной и пальпебральной туберкулиновой пробой на ППД-туберкулин для млекопитающих реагировало 2 (16,6%) головы с утолщением кожной складки на 3–5 мм, а на ППД-туберкулин для птиц 9 (75,0%). Внутривенные реакции на оба аллергена совпали в 1 (8,3%) случае, при этом животное реагировало и на пальпебральную пробу в три креста. При убое у этой коровы был установлен туберкулез в бронхиальном лимфатическом узле, а у другой коровы, реагировавшей с утолщением кожной складки на 3 мм, при ветсанэкспертизе туши установили эхинококкоз легких и печени (рис. 3).



Рис. 3. Эхинококковое поражение печени и легких

При исследовании 856 дойных коров выявлены 86 (100%) реагирующих на ВТП с утолщением кожной складки на 5–15 мм. При контрольном убое 15 голов у всех была установлена генерализованная форма туберкулеза. На основании ВСЭ все животные сданы на убой. При переисследовании 68 коров методом «бустер-эффекта» у 33 (48,5%) животных реакции увеличились с 3–5 до 7–13 мм. При убое коров № 310 и № 1230 установлено крупноочаговое туберкулезное поражение в заглоточном и подчелюстном лимфатических узлах (рис. 4). Из взятых 22 проб молока от этих коров и из биоматериала выделены культуры микобактерий туберкулеза, биологическим методом типирования они отнесены бычьему виду.

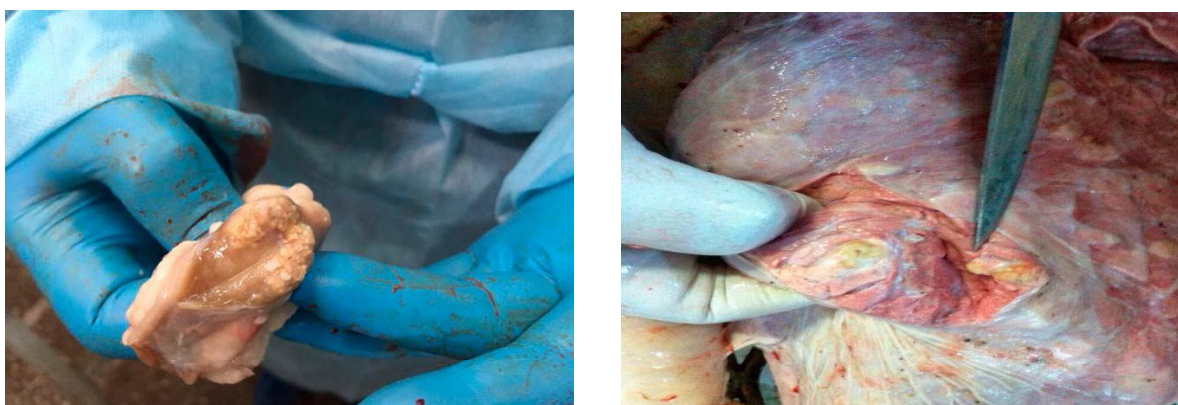


Рис. 4. Мелкоочаговое казеозное поражение заглоточного лимфоузла и легких

В ТОО «Баян» при переисследовании ранее реагировавших 37 голов туберкулином в дозе 5000 ТЕ выделено 3 (8,1%) коровы. При исследовании их через 14 дней пальпебральной туберкулиновой пробой 1 корова реагировала с утолщением нижнего века на четыре креста и 2 – отрицательно. При убое у коровы установили туберкулез в средостенном лимфатическом узле, а у не реагировавших на этот тест коров специфических изменений, свойственных туберкулезу, не обнаружили.

Поскольку туберкулез крупного рогатого скота наносит не только большой экономический ущерб, но и, являясь антропозоонозным заболеванием, представляет потенциальную опасность для человека, в дополнение к существующему комплексу противотуберкулезных мероприятий необходимо применять специфическую профилактику.

Изыскание экологически чистого антибактериального препарата проведено ИЭВСиДВ. Для этого подготовили экстрагированный раствор вытяжек из хитинового покрова и внутренней субстанции медведки.

Медведек умерщвляли гуманным методом, промывали проточной водой. Затем отделяли хитиновый покров и внутреннее содержимое в разные емкости и высушивали при 37 °С в течение 48 ч. Высушенный материал пропускали через шаровую мельницу и сито с размером ячейки 1 мм.

Навеску медведки 50,0 г, пропущенную через сито, помещали в сухую колбу вместимостью 500 мл. В колбу с навеской приливали 250 мл дистиллированной воды, лишенной CO₂ путем 30-минутного кипячения, колбу закрывали резиновой пробкой и взбалтывали 3 мин. Затем суспензию выливали на фильтр. Фильтрат собрали в коническую колбу вместимостью 500 мл.

Химический анализ содержимого медведки проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP- MS). Был определен количественный и качественный состав вытяжек из медведки по 26 химическим элементам, в т. ч. Ag, Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sn, Sr, Ti, V, Zn (табл. 1).

Биохимический состав вытяжек определяли, используя биохимический анализатор (длина волны 190–260 нм) (табл. 2).

Таблица 1

Результаты химического анализа вытяжек из медведки методом масс-спектрометрии, г/моль

Химический элемент	Вытяжка из хитинового покрова	Вытяжка из внутреннего содержимого
Ag	0,02	–
Al	0,035	Следы
As	–	–
B	–	Следы
Ba	–	–
Ca	18,67	2,91
Cd	–	–
Co	–	–
Cr	–	Следы
Cu	0,82	4,46
Fe	1,20	3,98
K	4,0	1,74
Li	–	–
Mg	0,24	3,65
Mn	Следы	–
Mo	–	–
Na	3,02	4,60
Ni	–	–
P	–	–
Pb	0,09	0,01
S	–	–
Sn	–	–
Sr	–	Следы
Ti	–	–
V	–	–
Zn	0,45	0,34

Таблица 2

Биохимические показатели вытяжек из медведки, мг/г

Показатель	Вытяжка из хитинового покрова	Вытяжка из внутреннего содержимого
Общий белок	30,0	640,0
Суммарный пул аминокислот	0,012	147,4
Суммарный пул азотистых оснований	136,4	392,0
Сухое вещество	846,0	273,4

Для определения бактерицидной активности компонентов вытяжки из хитинового покрова и из внутреннего содержимого медведки заложен бактериологический эксперимент. Были использованы культуры *M. bovis* шт. 8.

Референтный штамм культуры *M. bovis* был посеян на глицериновый картофель Павловского, затем пересеян на яичную среду Финн-2. С трехнедельными культурами микобактерий проводили дальнейшие исследования.

Было приготовлено 5 вариантов опытных сред:

1. Контроль.
2. Среда с добавлением гидразида изоникотиновой кислоты (контроль).
3. Среда с добавлением вытяжки из хитинового покрова медведки.
4. Среда с добавлением вытяжки из внутреннего содержимого медведки.

После этого в 20 пробирках каждого варианта сред были посеяны культуры *M. bovis*. Посевы инкубировали в течение 3 месяцев при температуре 37°C. Через каждые 10 дней проводили визуальный осмотр посевов на предмет интенсивности роста культур.

В модифицированной питательной среде КазНИВИ (инновационный патент № 23984) и на коммерческой среде проводили посев культур *M. bovis* шт. 8 с добавлением порошка медведки в разных концентрациях.

Для ускоренного выявления возбудителей микобактерий туберкулеза в лаборатории дополнительно исследовали кровь и в отдельных случаях биоматериал в сконструированной нами питательной среде со стимулятором роста (инновационный патент № 22779) с инкубированием в термостате, что позволило получить интенсивный рост микобактерий туберкулеза в течение 5–6 суток, а атипичных микобактерий – в течение 3 суток (рис. 5). На контрольной среде Гельберга и модифицированной питательной среде КазНИВИ первичный рост обнаруживается на 21–30-е и на 16–18-е сутки.

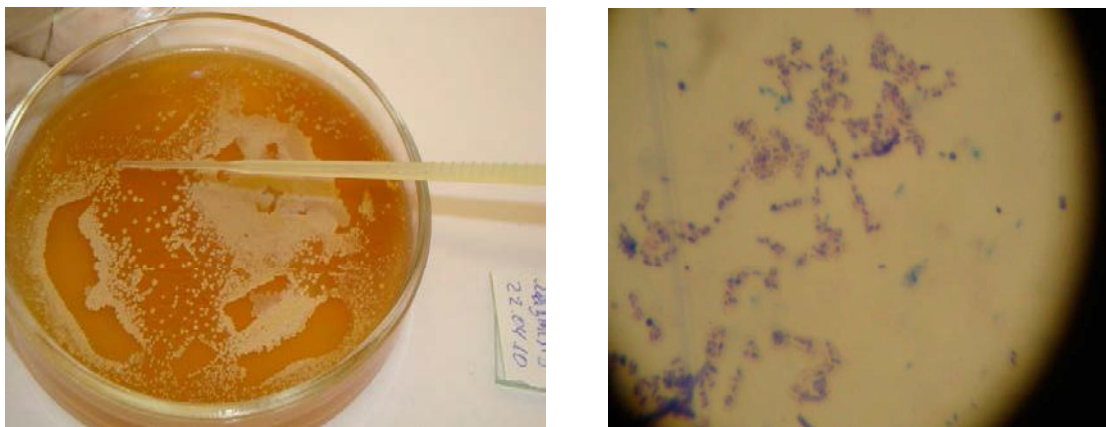


Рис. 5. Рост микобактерий туберкулеза на опытной питательной среде

Культурой *M. bovis* шт. 8 заразили 100 белых мышей и 50 морских свинок. Исследование продолжается.

Результаты химического и биохимического анализа вытяжек из хитинового покрова и внутреннего содержимого медведки показали их существенное различие. Наиболее активные составляющие выявлены в вытяжке из внутреннего содержимого медведки. Бактериологическими исследованиями на питательной среде отмечена задержка роста культур микобактерий туберкулеза. Разработка новых, экологически чистых, безвредных для организма людей и животных препаратов весьма актуальна [4–6], поэтому выделение, изучение и отработку методики применения туберкулоактивных веществ из вытяжек медведки мы считаем необходимым продолжить.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Жантиев Р. Д.* Медведки (Orthoptera, Gryllotalpidae) Европейской части СССР и Кавказа // Зоол. журнал. – 1991. – Т. 70, вып. 6. – С. 69–76.
2. *Щеголев В. Н.* Медведки // Энтомология. – М.: Высшая школа, 1964. – С. 86–87.
3. *Методы почвенно-зоологических исследований.* – М., 1964. – 277 с.
4. *Куренной П. И.* 10 рецептов народной медицины от русских травников. – М., 2007. – 104 с.
5. *Шәкіржанұлы З.* Шығыстың құпия рецептері және қазақ емшілігі. – Алматы, 2010. – 160 б.
6. *Алдашев А., Әлімханов Ж.* Қазақтың халық медицинасының құпиясы. – Алматы: Қазақстан, 1992. – 127 б.